Həyat elmləri və biotibb jurnalı, cild 74, №2, səh. 83-89 (2019)

Изучение изменений основных биохимических показателей крови в динамике развития модифицированного аллоксанового диабета у крыс

Х.Р. Ахундова

НИЦ и кафедра Семейной медицины Азербайджанского медицинского университета, Е.Гасымзаде, 14, Баку AZ1007, Азербайджан; E-mail: xumra_akhundova@mail.ru

Принята к печати: 21.12.2019

В статье приводятся данные биохимических изменений в крови экспериментальных крыс на фоне модифицированного аллоксанового диабета в динамике. При этом отмечается нарушение в организме баланса между прооксидантной системой и системой антиоксидантной защиты, что в различной степени выраженности сопровождается дефицитом инсулина. Возникающий при сахарном диабете окисидативный стресс представляет собой замкнутый порочный круг, поскольку способствует увеличению источников образования свободных радикалов и ослаблению активности антиоксидантной системы, что, в свою очередь, приводит к повреждению тканей. Оксидативный стресс сопровождается уменьшением усвоения и расходом глюкозы жировой тканью, нарушением секреции инсулина β-клетками, увеличением скорости ПОЛ, в результате которого возникает метаболический синдром.

Ключевые слова: *Аллоксан тригидрат, сахарный диабет, экспериментальные крысы, биохимия крови.*

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленными исследованиями показано, что при сахарном диабете (СД) возникшая гипоксия, приводит к активации образования высокотоксичных для клетки организма свободнорадикальных продуктов промежуточного обмена кислорода (Иванов и др., 2010). Отрицательная роль свободнорадикальных процессов при сахарном диабете подтверждается на практике тем, что антиоксиданты существенно ослабляют нарушения, связанные с гипоксией, особенно в постгипоксическом периоде. Развитие оксидативного стресса и микроангиопатии связано с накоплением в сосудистой стенке липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), активизацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), увеличением образования свободных радикалов, подавлением синтеза антиоксидантных ферментов (Аметов и др., 2003). Таким образом, сахарный диабет является тригерным механизмом запуска развития окислительного стресса, в результате чего увеличивается содержание субстратов окисления (глюкоза и липиды) и снижается активность естественных антиоксидантных систем (супероксиддисмутаза, каталаза, глутаминовая пероксидаза), изменяется структура липидного обмена в печени (Viswanathaswaing, 2011).

Является доказанным факт повреждения липидного биослоя клеточных мембран при усилении данного окисления. В этом аспекте изменение, возникающие при активации ПОЛ в организме, рассматривается как синдром пероксидации (Мажуль, 1987; Иванов и др., 2010).

В противовес свободнорадикальным процессам в организме существует антиоксидантная система (АОС), представляющая собой совокупность защитных механизмов клеток, тканей, органов и систем, направленных на сохранение и поддержание гомеостаза в организме. Равновесие между этими двумя противоположными составляющими в состоянии физиологического оптимума удерживает перекисное окисление на определенном низком уровне, препятствуя развитию цепного окислительного процесса, что собственно и характеризует антиоксидантный статус организма (Baynes et al., 2000).

Целью исследования явилась изучение изменений некоторых наиболее важных биохимических показателей сыворотки крови на фоне воспроизведенной аллоксановой модели сахарного диабета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биохимические исследования выполнены на 120 беспородных белых крысах массой 180 - 220 г, которых делили на группы и подгруппы, согласно задачам исследования.

Избирательное повреждение β-клеток поджелудочной железы осуществляли методом модифицированного моделирования сахарного диабета при введении аллоксана тригидрата (производства фирмы "La Chema", Чехия). Аллоксана тригидрат вводили по схеме внутрибрюшинно в дозе 170 мг/кг.

Острая форма аллоксановой модели характеризуется высокой летальностью порядка 60-80% от исходного (Закирьянов и др., 2007; Chatzigeorgion et al., 2009; Etuk, 2010). В этой связи мы в своих экспериментах использовали модифицированный метод дробного введения аллоксана тригидрата (Джафарова, 2015). При данном методе падеж составляет порядка 20-30% от исходного. Метод заключается в предварительной суточной пищевой депривации крыс со свободным доступом к воде. На этом фоне дробное введение аллоксана тригидрата в дозе 170 мг/кг (на 1, 2 и 4 сутки) позволяет к 10 дню моделирования получить устойчивое повышение уровня глюкозы до 480-520 mg/dl при незначительной летальности грызунов. По автору модернизированной методики введение аллоксана в дозах ниже диабетогенных на протяжении длительного времени может привести к развитию гипергликемии, глюкозурии и морфологическим изменениям в β - клетках поджелудочной железы. Моделироваие производится по следующей схеме: в первый день животным вводится 2/3 дозы, во второй день 1/3 дозы, через день дополнительно аллоксана тригидрат вводится в количестве 1/3 от общей дозы. При введении аллоксана животным повышение содержания глюкозы выше 350 мг/дл указывает на достижение желаемого результата моделирования сахарного диабета. В течение всего периода воспроизведения аллоксановой модели наблюдали за состоянием животных, изменением массы тела, поведения, температуры, мотивации к воде и пище, состоянием шерстки и другие. Содержание инсулина определяли набором реактивов (Demeniteckillwellsee, Германия), изменения продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов и малонового диальдегида - фотоколориметрическим методом по окрашенным продуктам тиобарбитуровой кислоты методом В.П. Гаврилова и др. (1987), показатели содержания каталазы по методу М.А.Королюк (1988), общей антиоксидантной активности – по методу C.Rice-Evans и соавт. (2000). Определение содержания глюкозы, триглицеридов, ОХ, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП, а также активности ферментов ЩФ, АСТ, АЛТ, γ-ГТ проводили ферментативным методом на приборе BioScreen MS-2000 (USA) с использованием набора реактивов Human (Германия). Статистическая обработка результатов проведены методами дисперсионного (F-Ficher) и вариационного (U-Mann-Whitney) анализов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении биохимических показателей крови в динамике развития модифицированного аллоксанового диабета у крыс выявили следующие изменения. На экспериментальной модели СД, вызванного введением аллоксана, поражение β-клеток островков Лангерганса приводит к частичному или полному нарушению секреции инсулина и длительной гипергликемии. На модели диабета глюкоза в плазме крови повышается в 4 и более раза и доходит в среднем до отметок 491,6 мг/дл. При этом минимальная концентрация глюкозы составляла 469 мг/дл, а максимальная 514,0 мг/дл (табл. 1).

Как следует из представленной в таблицы 1, у животных на фоне введения аллоксана через 10 дней наблюдалось снижение каталазной и пероксидазной активностей в 1,4 раза ($p<0,001$) и 1,1 раза ($p<0,001$) соответственно по сравнению с интактной группой. Общая антиоксидантная активность снизилась в 1,2 раза ($p<0,001$). На 10-ые сутки эксперимента отмечается также повышение концентрации таких

прооксидантных показателей как МДА и ДК. Так, после индукции аллоксаном при экспериментальном СД средняя математическая концентрация МДА составила 14,3 мкмоль/л, минимальный показатель 11,8 мкмоль/л, а максимальный показатель составил 17,2 мкмоль/л (табл. 2). Сравнение полученных результатов концентрации МДА с интактными крысами показывает достоверное увеличение в 3,6 раза.

Об этом свидетельствует также повышение уровня первичного продукта ПОЛ – ДК, а также вторичного продукта - МДА при аллоксановом диабете. Из таблицы 2 видно также повышение уровня МДА в сыворотке крови с 4,03±0,88 до 14,24±2,1 в течение 10 суток, что составляет 253,9% по сравнению с интактной группой. Наравне с этим наблюдается повышение уровня ДК с 6,72 ±0,06 до 14,3±0,06 nmol/ml, что составляет 218,2% по сравнению с группой интактных животных.

Определение содержания ПОЛ интактных животных показало, что содержание первичных (ДК) и вторичных (МДА) продуктов свободно радикального окисления липидов в сыворотке крови возрастает. На фоне увеличения содержания токсичных продуктов ПОЛ активность ферментов антиоксидантной системы к 10 суткам после введения аллоксана имеют тенденцию к уменьшению.

Из вышеуказанного видно, что наряду с увеличением свободно радикального окисления липидов, приводящие к нарушению структуры плазматической мембраны при аллоксановом диабете, наблюдается изменения в системе АОЗ. В крови к 10-ым суткам аллоксановой модели имеет место снижение активности каталазы и пероксидазы, что объясняется чувствительностью данных ферментов к усилению окислительных процессов в клетке. В этом аспекте результаты наших исследований подтвердили многочисленные данные литературы об интенсификации перекисного окисления липидов (ПОЛ) при сахарном диабете (Гасимова и др., 2017).

Анализируя результаты, полученные у животных с аллоксановым диабетом, можно проследить нарушение активности ферментов АОС на фоне повышения интенсивности свободно-радикального окисления (Elsner et al., 2006; Selyatitskaya et al., 2008).

Таблица1. Изменение концентрации глюкозы и антиокислительной активности крови у крыс на фоне аллоксановой модели (*n*=10, *M*±*m*).

Группы	**Статистические показатели**	**Глюкоза, мг/дл**	**Каталаза, ммоль/л**	**Общая антиоксидантная активность, ммоль/л**	**Пероксидаза, ммоль/л**
Интактная группа	M	119,2 ±1,1	0,30±0,003	37,9±0,5	87,2±0,5
	min - max	114,0-124,0	0,29-0,32	35,8 – 41,0	84,4 – 90,1
Аллюксановая модель на 10 день	M	491,6±5,5*	0,21±0,015	31,3±0,7	81,6±1,0
	min - max	469,0-514,0	0,17-0,29	28,7 - 341	78,2 – 87.1

Достоверность различий при *(p<0,001)

Таблица 2. Изменение продуктов перекисного окисления липидов крови у крыс на фоне аллоксановой модели (n=10, *M*±*m*)

Группы	**Статистические показатели**	**Малоновый диальдегид, мкмоль/л**	**Диеновые конъюгаты, Д232/мл**
Интактная группа	M	4,0±0,2	6,7±0,4
	min - max	3,15 – 5,02	5,12 - 8,24
Аллюксановая модель на 10 день	M	14,3 ± 0,6*	21,4 ± 0,8*
	min - max	11,8 – 17,2	17,9 - 24,5

Достоверность различий при *(p<0,001)

Таблица 3. Изменение ферментных показателей крови у крыс на фоне аллоксановой модели *(n=10, M±m)*

Группы	Статистические показатели	Аланинаминотрансфераза, u/l	Аспартатаминотрансфераза, u/l	Гаммаглутанотрансфераза, u/l	Щелочная фосфатаза, u/l
Интактная группа	M	61,7 ± 0,8	251,9 ± 1,7	27,1 ± 0,1	329,9 ± 4,4
	min - max	57,8 - 65,6	246-263	24,3 – 31,1	310 - 353
Аллюксановая модель на 10 день	M	92,2 ± 1,3*	315,2 ±1,1	50,9 ± 1,1*	643,5 ± 2,9*
	min - max	87,4 – 98,5	312,0 – 321,0	47,0 – 55,9	632,0- 655,0

Достоверность различий при *(p<0,001)

Таблица 4. Изменение липидного обмена крови у крыс на фоне аллоксановой модели *(n=10, M±m)*

Группы	Статистические показатели	Общий холестерин, ммоль/л	Триглицериды, ммоль/л	Липопротеиды высокой плотности, ммоль/л	Липопротеиды низкой плотности, ммоль/л	Липопротеиды очень низкой плотности, ммоль/л
Интактная группа	M	51,0 ± 0,9	39,1 ± 1,1	15,8 ± 0,8	27,3 ± 0,6	8,37 ± 0,32
	min - max	46,4-55,3	33,1-45,0	14,4-19,1	24,1-32,3	3,7-6,2
Аллюксановая модель на 10 день	M	88 ± 0,9*	120,8 ±0,9*	11,0 ±0,6	34,3 ± 0,7	13,2 ± 0,65
	min - max	55,5-63,0	116,0-124,0	7,9 -13,2	32,0-37,7	12,5-16,1

Достоверность различий при *(p<0,001)

В рамках влияния аллоксана на организм крыс нами также проведены анализы по оценки изменения биохимического метаболизма в печени при СД (табл. 3). Введение аллоксана животным привела к повышению активности АЛТ, АСТ, γ-ГТ и щелочной фосфатазы. Так к 10-ым суткам наблюдалось повышение активности АЛТ, АСТ, γ- ГТ в 1,5 раза (p<0,001), в 1,3 раза (p<0,001) и 1,9 раза (p<0,001) соответственно по сравнению с интактной группой. Выявлены увеличение активности щелочной фосфатазы в 2 раза (p<0,001) по сравнению с группой интактных животных. Можно видеть характерное преобладание повышения уровня АЛТ над уровнем АСТ.

Маркеры холестаза, такие как ЩФ, γ-ГТ также повысились на 95,1% и 88% соответственно. Обращает на себя внимание повышенная активность этих ферментов, что может быть связана у животных с СД, как холестатической реакцией поврежденной печени, так же и с нарушением способности печеночных клеток к катаболизму ЩФ. Указанные изменения биохимических показателей крови может свидетельствовать об активации дегенеративных процессов в печени в ответ на введение аллоксана.

Одной из важнейших звеньев и специфической картины СД является диабетическая дислипидемия. Состояние липидного обмена характеризовали, определяя содержание общего холестерина (ОХ), липопротеидов высокой и низкой плотности (ЛПВП и ЛПНП), липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), а также триглицеридов (Viswanathaswaing, 2011).

Согласно результатом нашего исследования, у крыс с аллоксановым диабетом наблюдалось нарушение липидного обмена, который проявлялся в повышение содержания в сыворотке триглицеридов, ЛПНП, ЛПОНП и общего холестерина, а также в снижении содержания ЛПВП (табл. 4).

Таким образом, данные изменения в крови животных на 10-ые сутки экспериментального СД указывают на развитие специфической картины диабетической дислипидемии. Согласно полученным результатам при введении аллоксана подопытным животным, наряду с гипергликемией развивается умеренная гиперлипидемия, что совпадает с данными литературы (Viswanathaswaing, 2011). В результате гипергликемии у животных в ходе эксперимента активируется процесс липолиза. По данным литературы, в результате этого в кровеносное русло высвобождаются свободные жирные кислоты, которые в печени превращаются в триглицериды и секретируется в виде атерогенных ЛПНП и ЛПОНП. В ходе экспериментов нами

было установлено, что аллоксан-индуцированный диабет привел к усиленному образованию первичных и вторичных продуктов ПОЛ (табл.1), что в свою очередь способствовало увеличению содержания ЛПНП и ЛПОНП, а также снижению ЛПВП (табл.3). Повышенное содержания ТГ и ОХС в сыворотке при СД сопровождалось снижением уровня холестерина ЛПВП. Снижение холестерина ЛПВП свидетельствует о нарушении метаболизма ОХС, потому что ЛПВП участвуют в поглощение ОХС из тканей. Прежде всего, увеличение содержания ТГ предполагает увеличение содержания ЛПОНП.

Как следует из представленных выше данных, у животных наряду с гиперлипидемией, активацией ПОЛ, наблюдалось также ослабление антиоксидантной защиты, проявляющегося в снижение каталазной и пероксидазной активности в сыворотке. Повышение в крови уровней прооксидантов (МДА, ДК) ослабило функцию АОЗ. Увеличение первичных и вторичных продуктов ПОЛ приводит к нарушению структуры и свойств клеточной мембраны. Компоненты АОС каталаза и пероксидаза оказываются чувствительными к усилению оксидативного стресса в клетке, что проявляется снижением их активности.

Результаты исследования свидетельствует о том, что при развитии СД изменение в липидном составе имеет, видимо атеросклеротическую направленность.

У подопытных крыс после введения аллоксана наблюдалось повышение активности АЛТ, АСТ, γ-ГТ и щелочной фосфатазы. Такие изменения активности ферментов азотистого обмена в печени свидетельствуют об увеличении катаболизма аминокислот у крыс с СД (Черкасова и др., 2011).

Итак, на фоне моделированного аллоксаном сахарного диабета отмечается нарушение в организме баланса между прооксидантной системой и системой антиоксидантной защиты, что в различной степени выраженности сопровождается дефицитом инсулина. Возникающий при этом окисидативный стресс при СД представляет собой замкнутый, порочный круг в связи с увеличением источников образования свободных радикалов, ослаблением активности АОС, которое ведет к повреждению тканей. Оксидативный стресс сопровождается уменьшением усвоения и расходом глюкозы жировой тканью, нарушением секреции инсулина β-клетками, увеличением скорости ПОЛ, в результате которого возникает метаболический синдром.

Таким образом, для лечения больных СД требуются вещества, которые не только нормализуют гипергликемию, но и ограничивают образование свободных радикалов, одновременно блокируя основные пути развития данного заболевания, повышая при этом активность антиоксидантной системы. Таковыми могут быть лекарственн - растительные средства с антиоксидантными и антиокислительными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. При моделировании сахарного диабета путем дробного введения аллоксана развивается стойкая и продолжительная гипергликемия, способствующая оксидативному стрессу; последний характеризуется изменением биохимического статуса экспериментальных крыс.
2. Наравне с изменениями ферментных показателей крови нарушается липидный обмен, проявляющиеся повышением содержания общего холестерина, триглецеридов, ЛПНП, ЛПОНП, но снижением содержания ЛПВП.
3. Возникающий при сахарном диабете окисидативный стресс представляет собой замкнутый, порочный круг в связи с увеличением источников образования свободных радикалов, ослаблением активности АОС, который ведет к повреждению тканей.

ЛИТЕРАТУРА

Аметов А.С., Соловьева О.А. (2011) Окислительный стресс при сахарном диабете 2-го типа и пути его коррекции. Проблемы эндокринологии, **№ 6:** с. 52-56.

Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. (1987) Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в

сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. *Вопросы мед. химии*, **№1:** 118-122.

Гасимова А.Ш., Алиев С.Д., Алиев М.Х., Алиев Э.М, Джафарова Н.А., Мамедзаде А.Я., Алиев О.С., Шахвердиев Г.Г. (2017) Окислительный стрес в патогенезе нарушений микролимфоциркуляции при сахарном диабете. *Вестник Казахстана*, **№1:** 13-17.

Джафарова Р.Э. (2013) Сравнительное исследование различных моделей аллоксан-индуцированного сахарного диабета. *Казанский медицинский журнал*, **№6:** 915-914.

Закирьянов А.Р., Плахотский М.А., Онищенко Н.А. (2007). Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, **№4:** 21-25.

Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степова Е.А., Жаворонок Т.В., Новицкий В.В. (2010) Перекисное окисление липидов и система глутатиона в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом. *Сибирский научный медицинский журнал*, **30(№6):** 101-104.

Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988). Метод определения каталазы. *Лабораторное дело*, *«Медицина»,* **№1:** 16-19.

Мажуль Л.М. (1987) Некоторые показатели перекисного окисления липидов в крови крыс раннего возраста при алоксановом диабете. *Вопросы медицинской химии*, **№2:** 41-44.

Черкасова О.П., Кузнецова Н.В., Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г. (2011) Активность адреналокортикальной системы при экспериментальном диабете у крыс. *Экпериментальная диабетология*, **№2:** 37-40.

Baynes J.W., Thorpe S.R. (2000). Oxidative stress in diabetes. *Antioxidants in diabetes management.* Ed.: L.Packer, N.Y. M.Dekker Inc., p. 77–92.

Chatzigeorgion A., Halapas A., Kalafatakis K., Kamper E. (2009) The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo*, **23(2):** 245-258.

Elsner M., Gurgul-Convey E., Lenzen S. (2006) Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen shecies for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. *Free Radic Biol. Med.*, **41:** 825-834.

Etuk E.U. (2010) Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric. Biol. J.N. Am.,* **1(2):** 130-134.

Rice-Evans C. (1994) Total antioxidant status in plazma and blood fluids. *Meth. Enzimol.*, **234(2):** 279-293.

Selyatitskaya V.G., Cherkasova O.P., Pankina T.V., Palchikova N.A. (2008) Functional state of adrenocortical sistem in rats with manifest alloxaninduced diabetes mellitus. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **6:** 708-710.

Viswanathaswamy A.H. (2011) Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of plectrathus amboinicus on normal and alloxainduced diabetic rats. *Ind. J. Pharm. Sci.*, **73:** 139-145.

Siçovullarda modifikasiya olunmuş alloksan diabetinin dinamikada inkişafının əsas biokimyəvi göstəricilərinin dəyişikliklərinin öyrənilməsi

X.R. Axundova

Azərbaycan Tibb Universitetimшm ETM və Ailə təbabəti kafedrası, Bakı, Azərbaycan

Məqalədə təcrübi siçovulların qanında modifikasiya olunmuş alloksan diabeti fonunda dinamikada biokimyəvi dəyişikliklərin rəqəmləri göstərilmişdir. Bu zaman orqanizmdə prooksidant sistemlə antioksidant müdafiə sistemləri arasında balans pozulur ki, bu da öz növbəsində müəyyən dərəcəli insulin qıtlığı ilə müşahidə edilir. Şəkərli diadet fonunda yaranan oksidativ stress özlüyündə qapalı qüsurlu dövran xarakteri daşıyır ki, bu zaman toxuma zədələnməsi törədən azad radikalların yaranma mənbələri artır, antioksidant sistem aktivliyi zəifləyir. Oksidativ stress piy toxuması ilə qlükozanın mənimsənilməsi və sərfinin azalması, β-hüceyrə tərəfindən insulin sekresiyasının pozulması, LPO sürətinin artması ilə müşayət olunur ki, nəticədə metabolik sindrom inkişaf edir.

Açar sözlər: *Alloksan trihidrat, şəkərli diabet, təcrübi siçovullar, qanın biokimyası*

Study of changes in basic biochemical indicators of blood in the dynamics of development of modified alloxan diabetes in rats

Kh.R. Akhundova

Research Center and Department of Family Medicine, Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

The article presents data on biochemical changes in the blood of experimental rats on the background of modified alloxan diabetes in dynamics. At the same time, there is a violation of the balance between the prooxidant system and the antioxidant defense system in the body, which is accompanied by insulin deficiency in varying degrees of severity. The arising oxidative stress in diabetes is a vicious cycle in connection with an increase in the sources of free radical formation, a weakening of the activity of the antioxidant system, which leads to tissue damage. Oxidative stress is accompanied by a decrease in the absorption and consumption of glucose by adipose tissue, impaired insulin secretion by β-cells, an increase in the rate of lipid peroxidation, which results in metabolic syndrome.

Keywords: *alloxan trihydrate, diabetes mellitus, experimental rats, blood biochemistry*